

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :

2 850 864

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national :

03 50023

(51) Int Cl⁷ : A 61 K 7/06, A 61 K 7/02, 7/04

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 12.02.03.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 13.08.04 Bulletin 04/33.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : L'OREAL Société anonyme — FR.

(72) Inventeur(s) : MICHELET JEAN FRANCOIS et
COMMO STEPHANE.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : L'OREAL.

(54) UTILISATION D'UN INHIBITEUR DE 15-HYDROXY PROSTAGLANDINE DESHYDROGENASE POUR
FAVORISER LA PIGMENTATION DE LA PEAU OU DES PHANERES.

(57) L'invention concerne l'utilisation d'au moins un inhibi-
teur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase dans
une composition ou pour la préparation d'une composition
destinée à favoriser la pigmentation de la peau et/ou des
phanères. Elle concerne également des compositions con-
tenant un tel inhibiteur et un procédé cosmétique pour favo-
riser la pigmentation de la peau, des poils et/ou des
cheveux

FR 2 850 864 - A1



BEST AVAILABLE COPY

On sait que dans la plupart des populations la coloration brune de la peau et le maintien d'une coloration constante du cheveu sont des aspirations importantes.

Il est admis que l'apparition de poils et/ou de cheveux gris ou blancs, ou canitie, est associée à une diminution de mélanine dans la tige pileuse. Ce phénomène survient naturellement au cours de la vie d'un individu. Toutefois, l'être humain cherche à avoir un aspect plus jeune et dans un but esthétique, il est souvent tenté de lutter contre ce phénomène, surtout lorsqu'il se produit à un âge relativement précoce.

On a ainsi proposé de nombreuses solutions dans le domaine de la coloration artificielle par apport de colorants exogènes visant à donner aux cheveux une coloration la plus proche possible de ce qu'elle est naturellement. Une autre approche consiste à stimuler la voie naturelle de la pigmentation.

Parmi les solutions proposées, on peut citer des compositions contenant un inhibiteur de phosphodiésterases (WO9517161), des fragments d'ADN (WO9501773), du diacyl glycérol (WO9404122), des prostaglandines (WO9511003) ou des dérivés de pyrimidine 3-oxyde (EP829260).

Cependant il existe toujours un besoin de nouvelles solutions efficaces pour favoriser la pigmentation de la peau, des cheveux et/ou des poils et donc prévenir ou diminuer la canitie.

De manière inattendue, la demanderesse a maintenant trouvé qu'il était possible de stimuler la synthèse de mélanine par des mélanocytes en inhibant spécifiquement la dégradation des prostaglandines synthétisés par ces mélanocytes ou celles présentes dans son environnement.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase dans une composition ou pour la préparation d'une composition destinée à favoriser la pigmentation de la peau ou des phanères, en particulier des cheveux et/ou des poils.

On avait précédemment décrit l'implication de certaines prostaglandines dans la pigmentation chez l'homme ou chez l'animal, des poils ou de la peau. (Wand M., 1997, Arch. Ophthalmol, **115**; Abdel Malek et al, 1987, cancer Res., **47**)

Cependant, les prostaglandines sont des molécules au temps de demi-vie biologique très court et agissant de façon autocrine ou paracrine, ceci traduisant le caractère local

De manière inattendue, on a montré dans le cadre de la présente invention qu'il était possible d'inhiber spécifiquement la 15-PGDH présente au niveau de la papille dermique et/ou du mélanocyte de cheveu. Une telle inhibition permet donc de freiner la désactivation des prostaglandines dans l'environnement du mélanocyte de cheveu. Les prostaglandines peuvent donc continuer par voie autocrine ou paracrine de stimuler les mélanocytes. En effet, l'application de tels inhibiteurs stimule la production par les mélanocytes de mélanine.

Par phanères, on entend l'ensemble des annexes tégumentaires et notamment les ongles, les poils et les cheveux. Par poils et cheveux on entend l'ensemble des annexes pileuses et notamment également les cils et les sourcils.

Les compositions selon l'invention pourront être appliquées par toute voie appropriée, notamment orale, parentérale ou topique externe, et leur formulation sera adaptée par l'homme du métier, en particulier pour des compositions cosmétiques ou dermatologiques. Avantageusement, les compositions selon l'invention sont destinées à une administration par voie topique. Elles contiennent un milieu physiologiquement acceptable, en particulier un milieu cosmétologiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement acceptable.

Dans un mode de réalisation préféré, une composition selon l'invention contient des excipients adaptés à une administration sur le cuir chevelu.

Le milieu physiologiquement acceptable dans lequel on utilise les inhibiteurs de 15-PGDH selon l'invention peut être anhydre ou aqueux.

La composition peut comprendre un milieu cosmétologiquement acceptable pouvant être constitué d'eau ou d'un mélange d'eau et d'au moins un solvant choisi parmi les solvants organiques hydrophiles, les solvants organiques lipophiles, les solvants organiques amphiphiles et leurs mélanges.

On entend par milieu anhydre, un milieu solvant contenant moins de 1% d'eau. Ce milieu peut être constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants choisi plus particulièrement parmi les alcools inférieurs en C2-C4 comme l'alcool éthylique, les alkylèneglycols comme le propylèneglycol, et les alkyléthers d'alkylèneglycols ou de dialkylèneglycols, dont les radicaux alkyle ou alkylène contiennent de 1 à 4 atomes de carbone. On entend par milieu aqueux, un milieu constitué par de l'eau ou un mélange d'eau et d'un autre solvant physiologiquement acceptable, choisi notamment parmi les solvants organiques

surface de l'ongle.

Les quantités des différents constituants des compositions utilisables selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5% à 80% en poids, et de préférence de 5% à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsifiants et les co-émulsifiants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsifiant et le co-émulsifiant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3% à 30% en poids, et de préférence de 0,5 à 20% en poids par rapport au poids total de la composition. L'émulsion peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une solution ou un gel huileux, la phase grasse peut représenter plus de 90% du poids total de la composition.

Avantageusement, la composition comprendra des microsphères, des nanosphères, des liposomes, des oléosomes ou des nanocapsules, dans lesquels au moins un agent inhibiteur de la 15-PGDH sera encapsulé. Des exemples de telles formulations sont décrits notamment dans les brevets EP199636, EP 375520, EP447318, EP557489, WO 97/12602, EP1151741 ou US 5 914126.

A titre d'exemple, les microsphères pourront être préparées selon la méthode décrite dans la demande de brevet EP 0 375 520.

Les nanosphères pourront se présenter sous forme de suspension aqueuse et être préparées selon les méthodes décrites dans les demandes de brevet FR 0015686 et FR 0101438.

Les oléosomes consistent en une émulsion huile dans eau formée par des globules huileux pourvus d'un enrobage cristallin lamellaire dispersé dans une phase aqueuse (voir les demandes de brevet EP 0 641 557 et EP 0 705 593).

L'inhibiteur de 15PGDH pourra aussi être encapsulé dans des nanocapsules consistant en un enrobage lamellaire obtenu à partir d'un tensio-actif siliconé tel que décrit dans la demande de brevet EP 0 780 115; les nanocapsules pourront également être préparées

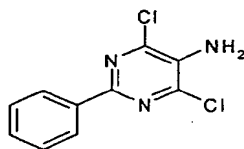
6% par rapport au poids total de la composition.

De préférence, le ou les agents inhibiteurs sont présents à une concentration de 0,001% à 5% p/v par rapport à la composition, de manière encore préférée de 0,01 à 2%. Toutefois ces quantités seront adaptées par l'homme du métier selon le composé utilisé, pour obtenir une activité d'inhibition enzymatique équivalente à une inhibition pratiquement totale de l'enzyme 15-PGDH.

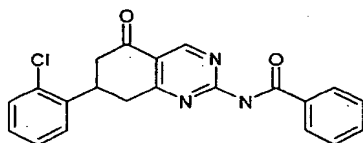
Des inhibiteurs de la 15-PGDH adaptés pourront être déterminés par l'homme du métier; l'agent inhibiteur sera notamment choisi parmi le traxanox, ses sels et ses esters, le nafazatrom, les sulfasalazines, le PhCL28A, ou les thiazolidinediones telles que décrites par Cho et al (Arch. Biochem. Biophys., 2002; 405, 247-251).

D'autres composés particulièrement adaptés à la mise en œuvre de l'invention sont les composés répondant aux formules suivantes :

Molécule A:



Molécule B:



Selon un mode de réalisation préféré, les compositions selon l'invention comprennent en outre au moins un agent bénéfique pour les cheveux tels que notamment les silicones, les huiles végétales, animales, minérales ou de synthèse, les cires, les céramides, les pseudocéramides, les polymères cationiques, les filtres solaires, les vitamines.

Selon une variante préférée, l'agent inhibiteur de 15 PGDH sera utilisé en association avec un composé actif pour favoriser la pigmentation des cheveux désavantageusement susceptible d'être métabolisé par cette enzyme. En effet, grâce aux travaux de la demanderesse, on sait maintenant que certains composés classiquement proposés à cet effet ont une activité moindre en raison de la présence de 15PGDH, qui par son action diminue la concentration et donc l'efficacité des substances au niveau du site d'action.

Conformément à la présente invention, on peut désormais obtenir des compositions ayant une efficacité renforcée, en associant un composé actif pour favoriser la pigmentation des cheveux, susceptible d'être métabolisé par la 15PGDH et un inhibiteur de la 15PGDH tel que défini précédemment. On obtiendra ainsi une action synergique des actifs pour favoriser la pigmentation des cheveux dans ces compositions.

La composition contiendra par exemple en outre au moins un composé choisi parmi les prostaglandines, notamment la prostaglandine PGE1, PGE2, leurs sels, leurs esters, leurs analogues et leurs dérivés, notamment ceux décrits dans WO 98/33497, WO 95/11003, JP 97-100091, JP 96134242, en particulier les agonistes des récepteurs des prostaglandines. Elle peut notamment contenir au moins un composé tel les agonistes (sous forme acide ou sous forme d'un précurseur notamment sous forme ester) du récepteur de la prostaglandine F2 alpha (FP-R) à l'exemple du latanoprost, du fluprostenol, du cloprostenol, du travoprost, le bimatoprost, les agonistes (et leurs précurseurs notamment les esters) des récepteurs de la prostaglandine E2 (EP1-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R) tel le 17 phényle PGE2, le viprostol, le butaprost, le misoprostol, le sulprostone, le 16,16 diméthyle PGE2, 11 désoxy-PGE1, le 1 désoxy PGE1, les agonistes et leurs précurseurs notamment les esters du récepteur de la prostacycline (IP) tel le cicaprost, l'iloprost, l'isopcarbacycline, le beraprost, les agonistes et leurs précurseurs notamment les esters du récepteur de la prostaglandine D2 tel le BW245C ((4S)-(3-[(3R,S)-3-cyclohexyl-3-isopropyl]-2,5-dioxo)4-imidazolidineheptanoic acid), le BW246C ((4R)-(3-[(3R,S)-3-cyclohexyl-3-isopropyl]-2,5-dioxo)4-imidazolidineheptanoic acid) les agonistes et leurs précurseurs notamment les esters du récepteur aux thromboxanes A2 (TP) tel le I-BOP ([1S-[1a,2a(Z), 3b(1E,3S),4a]]-7-[3-[3-hydroxy-4-[4-(iodophenoxy)-1-butenyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid

Avantageusement, la composition selon l'invention comprendra au moins un inhibiteur de la 15PGDH tel que défini précédemment et au moins une prostaglandine ou un dérivé de prostaglandine comme par exemple les prostaglandines de la série 2 dont notamment PGF 2 α et PGE 2 sous forme salines ou sous forme de précurseurs notamment des esters (exemple les isopropyl esters), leurs dérivés comme le 16,16

asiatique, l'hinokitiol, mipirocine, et les composés décrits dans EP680745, le chlorhydrate de clinycine, le peroxyde de benzoyle ou de benzyl et la minocycline.

Les rétinoïdes pourront être choisis parmi l'isotrétinoïne, l'acitrétine et le tazarotène.

D'autres composés actifs pour favoriser la pousse et/ou limiter la chute des cheveux présents dans les compositions pourront également être choisis dans le groupe comprenant l'aminexil et ses dérivés, le 6-O-[(9Z,12Z)-octadéca-9,12-diénoyl]hexapyranose, chlorure de benzakonium, chlorure de benzethonium, phénol, oestradiol, maléate de chlorphéniramine, les dérivés de chlorophylline, cholestérol, cystéine, méthionine, nicotinate de benzyle, menthol, huile de menthe poivrée, panthoténate de calcium, panthénol, résorcinol, les activateurs de la protéine kinase C, les inhibiteurs de la glycosidase, les inhibiteurs de glycosaminoglycanase, les esters d'acide pyroglutamique, les acides hexosaccharidiques ou acyl-hexosaccharique, éthylènes aryl substitués, les acides aminés N-acylés, les flavonoïdes, les dérivés et analogues d'ascomycine, les antagonistes d'histamine, les triterpènes comme l'acide ursolique et les composés décrits dans US 5529769, US 5468888, US 5631282, les saponines, les inhibiteurs de protéoglycanase, les agonistes et antagonistes d'estrogènes, pseudotriènes, les cytokines et les promoteurs de facteurs de croissance, les inhibiteurs d'IL-1 ou d'IL-6, les promoteurs d'IL-10, les inhibiteurs de TNF, les vitamines, comme la vitamine D, les analogues de la vitamine B12 et le panthoténol, les hydroxyacides, benzophénones et l'hydantoïne.

L'invention a également pour aspect un procédé cosmétique pour favoriser la pigmentation de la peau, des ongles, des poils et/ou des cheveux, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau et/ou le cuir chevelu et/ou les phanères au moins un inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase, ou une composition telle que définie précédemment. La composition ou l'inhibiteur de 15-PGDH seront appliqués au site d'action et seront laissés en contact pendant un temps plus ou moins long, l'application pouvant être répétée à intervalles réguliers ou non pendant plusieurs heures, jours, semaines ou mois.

L'inhibiteur de 15PGDH pourra être appliqué simultanément avec les autres actifs proposés en association ou de façon séquentielle dans le temps.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans en limiter la portée. Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes.

Le surnageant de culture cellulaire est éliminé et remplacé par 800 µl de tampon de lyse, le lysat obtenu est récupéré et introduit dans un microtube en polypropylène de 1,5 ml (tube 1).

1 ml de suspension de microsphères Oligo(dT-18) cellulose est introduit dans un microtube de 1,5 ml (tube 2) et centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé. Le contenu du tube 1 est alors introduit dans le tube 2, les microsphères sont remise en suspension dans le lysat par agitation douce du tube pendant 3 minutes.

Les ARNs polyA+ fixés sur les microsphères sont isolés des contaminants par des lavages. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est éliminé et remplacé par 1 ml de tampon de lavage (high salt buffer). Les microsphères sont remises en suspension comme précédemment et le tube est agité doucement pendant 1 minute. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est à nouveau éliminé et remplacé par 1ml de low salt buffer.

Au total cinq lavages avec le low salt buffer suivis de trois lavages avec le high salt buffer seront ainsi effectués.

Le contenu du troisième lavage (microsphères + tampon) est introduit sur une microcolonne contenant un filtre à la base (colonne microspin™) placée dans un microtube de 1,5 ml. L'ensemble est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. La microcolonne est récupérée et placée dans un microtube de 1,5 ml. Les ARN messagers polyA+ sont alors élués par un volume final total de 0,4 ml de tampon d'éluion préalablement porté à 65°C.

c- Synthèse des brins complémentaires d'ADN (ADNc) :

Cette étape est réalisée par l'utilisation du kit First strand cDNA synthesis (Pharmacia Biotech, Bruxelles, Belgique).

Les échantillons d'ADN complémentaires obtenus sont dilués au 1/10 ème dans de l'eau stérile avant PCR.

d- Choix des amorces, PCR (Poly Chain Reaction)

Des amorces spécifiques des séquences d'intérêts seront utilisées après synthèse à façon par Genset SA, rue Robert et Sonia Delaunay, Paris.

Le premier couples d'amorces s'hybridant sur la séquence codant pour une protéine ubiquitaire (la glyceraldéhyde 3 phosphodéshydrogénase). Les deux autres couples

Pesée de 0,65 g d'agar (Molecular biology certified agarose, Bio-Rad laboratories 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547, USA).

Ajout de 50 ml de tampon 1X TAE, Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

L'agarose en suspension est portée à ébullition puis introduite dans une cuve contenant une goutte de bromure d'éthidium (25 µg), Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

Un "peigne" permettant le dépôt des échantillons est placé à une extrémité de la cuve.

Après 30 minutes de refroidissement (température de la pièce), 20 µl des résultats de PCRs sont introduits individuellement dans un puits du gel, de même que 10 µl d'un standard échelle de poids moléculaires (Amplisize™, molecular Ruler, 170-8200), Bio-Rad.

L'ensemble est soumis en immersion dans un large excès de tampon TAE 1X à un champ électrique de 100 volts pendant 45 minutes.

L'exposition du gel sous un éclairage ultra-violet permet d'observer par fluorescence, les résultats obtenus.

Les résultats de l'étude de l'expression de la 15PGDH sont montrés sur la figure 1

A. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 1

B. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 2

M. Echelle de marqueurs moléculaires en paires de bases (pb)

A1, B1: expression de la 15-PGDH (706 pb)

A2,B2: expression de l'actine (gène de référence), (1096 pb)

Les gels montrant l'expression de la PGHS-1 sont représentés sur la figure 2:

A. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 1

B. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 2

M. Echelle de marqueurs moléculaires en paires de bases (pb)

A1, B1: expression de la PGHS-1 (451 pb)

A2,B2: expression de l'actine (gène de référence), (1096 pb).

Exemple 2: Mise en évidence de l'expression de l'ARNm de la 15PGDH dans les fibroblastes de papilles dermiques de cheveux en culture.

1. Dissection des follicules pileux.

Pour chaque échantillon (une culture cellulaire à confluence dans une boîte de 35 mm de diamètre) mis à l'étude, le protocole suivant sera appliqué.

Le surnageant de culture cellulaire est éliminé et remplacé par 800 µl de tampon de lyse, le lysat obtenu est récupéré et introduit dans un microtube en polypropylène de 1,5 ml (tube 1).

1 ml de suspension de microsphères Oligo(dT-18) cellulose est introduit dans un microtube de 1,5 ml (tube 2) et centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé. Le contenu du tube 1 est alors introduit dans le tube 2, les microsphères sont remise en suspension dans le lysat par agitation douce du tube pendant 3 minutes.

Les ARNs polyA⁺ fixés sur les microsphères sont isolés des contaminants par des lavages. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est éliminé et remplacé par 1 ml de tampon de lavage (high salt buffer). Les microsphères sont remises en suspension comme précédemment et le tube est agité doucement pendant 1 minute. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est à nouveau éliminé et remplacé par 1ml de low salt buffer.

Au total cinq lavages avec le low salt buffer suivis de trois lavages avec le high salt buffer seront ainsi effectués.

Le contenu du troisième lavage (microsphères + tampon) est introduit sur une microcolonne contenant un filtre à la base (colonne microspinTM) placée dans un microtube de 1,5 ml. L'ensemble est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. La microcolonne est récupérée et placée dans un microtube de 1,5 ml. Les ARN messagers polyA⁺ sont alors élués par un volume final total de 0,4 ml de tampon d'éluion préalablement porté à 65°C.

3. Précipitation des ARN messagers.

Dans le tube contenant l'éluat sont introduits 10 µl de solution de glycogène, 40 µl d'acétate de potassium 2,5M et 1 ml d'éthanol absolu à -20°C. Le tube est placé dans de la carboglace (-80°C). Après 1h00, le tube est centrifugé à 4°C à 17500 trs/min pendant 15 minutes. Le surnageant est précautionneusement éliminé (les ARNms forment un tout petit culot) et remplacé par 1ml d'éthanol 80% (éthanol/eau ; v/v) à -20°C. Le tube est centrifugé 15 min à 17500 trs/min à 4°C et le surnageant complètement éliminé. Le culot est repris par 8 µl d'eau distillée stérile.

La réaction PCR est réalisée selon une adaptation du protocole TAKARA Taq™, TAKARA Shuzo Co., LTD. Biomedical Group, Seta 3-4-1, Otsu, Shiga, 520-2193, Japon. La température d'hybridation est de 54°C pour les couples d'amorces (β -actine ; PGFS, 15PGDH), le nombre de cycles = 35.

*Une solution tamponnée de nucléotides est réalisée par mélange de 171 μ l d'eau distillée stérile, 24,5 μ l de tampon 10X du kit et 20 μ l de mélange de nucléotides (dNTP) du kit.

Sont introduits dans un microtube adapté à la PCR :

- 1 μ l (d'une dilution au 1/10) d'ADN complémentaire
- 43 μ l du mélange de nucléotides en solution tamponnée *
- 5 μ l (2,5 μ l + 2,5 μ l) des couples d'amorces à 40 ng/ μ l sont en réaction.
- 50 μ l d'huile minérale.

Le tube est placé dans un appareil pour PCR et les cycles suivants sont programmés:

4' à 95°C	1 cycle
30" à 94°C	
1' à 54°C	35 cycles
1' à 72°C	
7' à 72°C	1 cycle

6. Lecture

a. Préparation d'un gel d'agarose.

Pesée de 0,65 g d'agar (Molecular biology certified agarose, Bio-Rad laboratories 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547, USA).

Ajout de 50 ml de tampon 1X TAE, Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

L'agarose en suspension est porté à ébullition puis introduit dans une cuve contenant une goutte de bromure d'éthidium (25 μ g), Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

Un "peigne" permettant le dépôt des échantillons est placé à une extrémité de la cuve.

Le protocole de PCR appliqué pour le clonage de la 15-PGDH reprend dans les grandes lignes celui décrits précédemment à la différence près ci-dessous :

La Taq Polymérase utilisée selon les données du fabricant (Pfu Turbo[®] DNA Polymerase), Stratagene cloning systems, 11011 North Torrey Pines Road , La Jolla, CA 92037.

Température d'hybridation 59°C, temps d'élongation 2 min, 25 cycles au total pour la 15-PGDH, amplimère attendu = 815 pb.

c) Les produits de PCR sont digérés par les enzymes de restrictions (BamH1 ; Xho1 pour la 15-PGDH) selon les données du fabricant (Amersham Pharmacia biotech, 12 avenue des Tropiques, ZA Courtaboeuf, 91944 Les Ulis) puis mis à migrer individuellement sur un gel d'agarose à 1,3 % (voir exemple 1 ; 6. Lecture)

d) Découpe des bandes correspondantes aux amplimères attendus (voir ac) à l'aide d'un scalpel (après repérage sous ultra-violets) et purification de ces découpes selon les recommandations du fabricant du kit Wizard[®] PCR Preps DNA Purification system (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399).

e)

15-PGDH

Ligation dans un vecteur pGEX 4T3 (Amersham Pharmacia biotech, 12 avenue des Tropiques, ZA Courtaboeuf, 91944 Les Ulis) préalablement digéré (BamH1 / Xho1) et purifié, suivant les indications du fabricant du kit Fast-Link[™] DNA ligation kit, Epicentre, 1202 Ann Street, WI 53713.

f) Transformations.

Des bactéries compétentes de type BL21DE3plys seront utilisées pour la transformation avec la construction (pGEX4T3/15-PGDH). Cette souche est commercialisée par la société Stratagene. Les transformations sont réalisées selon un protocole classiquement appliqué tel que décrit par exemple dans le kit Fast-Link[™] DNA ligation précédemment utilisé. Les bactéries infectées (clones) sont sélectionnées (colonies blanches) après dépôt et culture 24h00 à 37°C d'une fraction

Les tubes sont placés verticalement sur un agitateur rotatif, rotation 10 tours par minutes pendant 1h00 à la température de la pièce (20-25°C), les.

Les tubes sont centrifugés 1000 trs/min pendant 3 minutes, le surnageant est éliminé. Sont introduits dans chacun des tubes 40 ml d'un tampon phosphate 10 mM pH = 7,00. Après agitation douce (retournement) les tubes sont à nouveau centrifugés 3 minutes à 1000 trs/min.

L'opération est réalisée 5 fois. Un sixième lavage est réalisé avec 40 ml de tampon phosphate salin pH = 7,2 (PBS, Bio-Merieux S , 69280 Marcy-l'Etoile). Après centrifugation le surnageant est à nouveau éliminé.

i) Elution de la 15-PGDH

Une suspension de *thrombin Protease* est reconstituée à 1 unité/ μ l dans du PBS selon les recommandations du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech, 12 avenue des Tropiques, ZA Courtaboeuf, 91944 Les Ulis).

Sont introduits dans chaque tube contenant 1 ml de Gluthatione-Sepharose[®] 4B, 950 μ l de PBS et 50 μ l de suspension de thrombine reconstituée. Ceux-ci sont agités en position légèrement inclinée 16h00 à 250 trs/min. Après 16h00 les tubes sont centrifugés à 3000 trs/min pendant 5min, les surnageants sont recueillis.

Une évaluation de la quantité de protéine est effectuée en suivant la procédure de dosage Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr, Hercules, CA 94547).

Ainsi pour la 15-PGDH on obtient entre 0,2 et 5 mg de protéine par ml, 1 mg /ml le plus souvent.

Les suspensions protéiques ainsi obtenues sont diluées respectivement dans du PBS additionné de 10% de glycérol et du PBS telle que les concentrations protéiques finales titrent 0,2 mg /ml pour la 15-PGDH. La suspension est bloquée à -80°C jusqu'à utilisation.

Des analyses électrophorétiques (SDS-Page) réalisées dans des conditions standards démontrent la qualité des résultats ainsi obtenus.

Exemple 4: Evaluation de l'effet de molécules sur ces enzymes et caractérisation de certaine famille molécules comme inhibiteurs de la 15 PGDH.

a) Test 15-PGDH.

REVENDICATIONS

- 1- Utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase dans une composition ou pour la préparation d'une composition destinée à favoriser la pigmentation de la peau ou des phanères.
- 2- Utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase selon la revendication 1 caractérisée en ce que la composition est destinée à une administration par voie topique.
- 3- Utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est encapsulé dans une structure choisie parmi les microsphères, les nanosphères, les oléosomes et les nanocapsules.
- 4- Utilisation non thérapeutique d'une composition cosmétique contenant au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase pour le traitement de la canitie.
- 5- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que la composition contient en outre au moins un agent favorisant la pigmentation des cheveux et/ou des poils différent d'un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase.
- 6- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la composition contient en outre au moins un agent accélérateur de pénétration.
- 7- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la composition contient en outre au moins une prostaglandine ou un dérivé de prostaglandine.
- 8- Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la composition contient en outre au moins un composé choisi parmi la prostaglandine PGE1, PGE2, leurs sels, leurs esters, leurs analogues et leurs dérivés, les agonistes du récepteur de la prostaglandine F2 alpha (FP-R) notamment le latanoprost, le fluprostenol, le cloprostenol, le travoprost, le bimatoprost, les agonistes des récepteurs de la prostaglandine E2 (EP1-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R) tel le 17 phényle PGE2, le

- 12- Utilisation selon l'une des revendications 2 à 11, caractérisée en ce que la composition comprend un milieu cosmétologiquement acceptable constitué d'eau ou d'un mélange d'eau et d'au moins un solvant choisi parmi les solvants organiques hydrophiles, les solvants organiques lipophiles, les solvants organiques amphiphiles et leurs mélanges.
- 13- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est présent dans la composition à une concentration comprise entre 0,001% et 5% p/v.
- 14- Procédé cosmétique pour favoriser la pigmentation de la peau, des poils et/ou des cheveux, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau et/ou le cuir chevelu au moins un inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase, ou une composition telle que définie dans l'une des revendications précédentes.
- 15- Composition susceptible d'être utilisée selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisée en ce qu'elle contient au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase et un agent favorisant la pigmentation de la peau, des cheveux et/ou des poils.

II

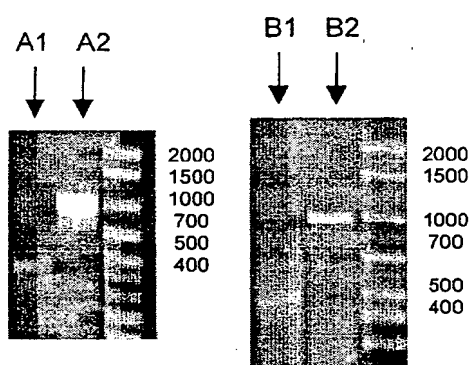


FIGURE 2



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

**N° d'enregistrement
national**

FA 632773
FR 0350023

[illegible]

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0350023 FA 632773**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **14-10-2003**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 884045 A	16-12-1998	AU 736351 B2	26-07-2001
		AU 6993398 A	10-12-1998
		CA 2239665 A1	06-12-1998
		EP 0884045 A1	16-12-1998
		JP 11012150 A	19-01-1999
		NZ 330613 A	28-01-1999
		US 6231837 B1	15-05-2001
		ZA 9804878 A	06-12-1999
WO 0117479 A	15-03-2001	AU 7360000 A	10-04-2001
		AU 7360700 A	10-04-2001
		EP 1214038 A2	19-06-2002
		EP 1214039 A2	19-06-2002
		WO 0117479 A2	15-03-2001
		WO 0117480 A2	15-03-2001
US 6103765 A	15-08-2000	AU 742787 B2	10-01-2002
		AU 8473498 A	08-02-1999
		EP 1005336 A1	07-06-2000
		JP 2001509480 T	24-07-2001
		NO 20000085 A	01-03-2000
		WO 9902147 A1	21-01-1999
		US 2002128314 A1	12-09-2002
		US 6414027 B1	02-07-2002
		US 6410595 B1	25-06-2002

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)